

L-glutamine separating and purifying process

Patent number: CN1224711
Publication date: 1999-08-04
Inventor: SHEN YALING (CN); SUN JIBIN (CN); XU PING (CN)
Applicant: UNIV SHANDONG (CN)
Classification:
- **international:** C07C229/26; C07C227/40
- **european:**
Application number: CN19980122157 19981228
Priority number(s): CN19980122157 19981228

Abstract of CN1224711

The present invention discloses a separation and purification process of L-glutamine. It effectively solves the problems of that the conversion of glutamine to glutamic acid, strong acid elution of glutamine and overlap of glutamine elution peaks, etc. seriously affect the yield and product purity and small operation scale in the course of glutamine separation. Said invention uses only a kind of anion-exchange resin, adopts dual-column series-connection mode to respectively exchange and adsorb the impurities of glutamic acid, etc. and glutamine, and utilizes weak acid selective elution one column to separate and extract glutamine. Said invented method is simple, high in yield, its product quality is attained to the medicinal standard, and its process scale is larger, and favourable for industrial production.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl⁶

C07C229/26

C07C227/40

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98122157.2

[43]公开日 1999年8月4日

[11]公开号 CN 1224711A

[22]申请日 98.12.28 [21]申请号 98122157.2

[71]申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山大南路 27 号

[72]发明人 沈亚领 许平 孙际宾

马翠卿 钱新民

[74]专利代理机构 山东大学专利事务所

代理人 李健康

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 L-谷氨酰胺的分离纯化工艺

[57]摘要

本发明公开了一种 L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，它有效地解决了谷氨酰胺在分离过程中向谷氨酸转化、强酸洗脱谷氨酰胺和谷氨酸洗脱峰重叠严重等影响收率和成品纯度及操作规模过小的问题。本发明仅用一种阴离子交换树脂，以双柱串联的方式分别交换吸附谷氨酸等杂质和谷氨酰胺，弱酸选择性洗脱一柱而分离提取出谷氨酰胺。本发明方法简练，收率较高，产品质量达到药品标准，而且工艺的规模较大，有利于放大到工业化生产。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，该工艺包括下述顺序的步骤：

(1) 发酵液絮凝除菌体：将谷氨酰胺发酵液调节至pH2.0—5.0，缓慢搅拌下以1—10毫升/升发酵液的量加入浓度为2—3%的高分子絮凝剂，然后加入500—2000ppm的金属盐，缓慢搅拌混合30—60分钟后静置30—60分钟，离心或过滤除去固相，用2—5倍固相体积的去离子水洗涤固相，收集滤液和洗涤水，合并后待用；

(2) 离子交换树脂的处理：强碱性离子交换树脂按常规方法处理后装柱，然后转成OH型后待用；

(3) 发酵液除去谷氨酸等杂质：由步骤(1)处理得到的合并液以0.1—4.0BV/小时的流速通入步骤(2)处理好的强碱性离子交换柱，通完液后同流速下用0.6—2倍床层体积的去离子水顶出柱中液体，收集所有离子交换柱的流出液待用；

(4) 离子交换吸附谷氨酰胺：由步骤(3)处理得到的料液以0.1—4.0BV/小时的流速通入步骤(2)处理好的强碱性离子交换柱，通完液后，相同流速下用0.5—5倍树脂床体积的去离子水洗柱，洗完后以0.1—3.0BV/小时的流速用0.01—2.0N的弱酸洗脱，收集谷氨酰胺高流份洗脱液待用；

(5) 谷氨酰胺洗脱液的真空浓缩：由步骤(4)处理得到的谷氨酰胺洗脱液在40°C—80°C下真空浓缩至谷氨酰胺浓度50—100克/升，保温待用；

(6) 谷氨酰胺浓缩液的脱色：将步骤(5)处理得到的谷氨酰胺浓缩液调至pH3.0—6.0，按0.1%—1.0%的比例加入药用级活性炭，50°C—80°C保温下搅拌0.5—1小时，然后同温下保温过滤数次至滤液中无炭粒；

(7) 谷氨酰胺浓缩液的结晶：将步骤(6)处理得到的谷氨酰胺脱色液调至pH4.0—6.5，然后以1—3°C/小时的降温速率降温，温度每降低10°C，停止降温并保温2—6小时，然后继续以同样速率降温，直至液温降至0°C—5°C后，维持结晶8—14小时后过滤，收集晶体待用；

(8) 谷氨酰胺的晶体洗涤：将步骤(7)处理得到的谷氨酰胺晶体以1—4毫升/克晶体的比例加入有机溶剂，35°C—45°C保温下搅拌1—3小时，过滤，收集晶体待用；

(9) 谷氨酰胺晶体的干燥：将步骤(8)处理得到的谷氨酰胺晶体在40°C—60°C下干燥6—8小时，然后80°C干燥1—4小时，冷却后即得谷氨酰胺成品；

上述过程所用的去离子水都须经脱二氧化碳处理，上柱方式为正上柱。

2. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤(1)所述的谷氨酰胺发酵液的pH用盐酸、硫酸、硝酸之一调节。

3. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤
(1)所述的高分子絮凝剂是阴离子型、阳离子型、非离子型聚丙烯酰胺之一。

4. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤
(1)加入的金属盐是硫酸铝、硫酸锌、氯化锌、三氯化铁之一。

5. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤
(2)所述的强碱性离子交换树脂是717#、711#、D2004、201×2、JK204、JK206
、D201、D202、D241、D293、JK208、D290、D296、D261之一。

6. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤
(4)所述的弱酸是甲酸、醋酸、柠檬酸之一。

7. 如权利要求1中所述的L-谷氨酰胺的分离纯化工艺，其特征在于，步骤
(8)所述的有机溶剂是甲醇、无水乙醇、95%乙醇、丙酮之一。

说 明 书

L-谷氨酰胺的分离纯化工艺

本发明属于药用氨基酸制备领域，具体涉及一种L-谷氨酰胺的分离纯化工艺。

谷氨酰胺曾经被认为是一种非必需性氨基酸，近年来，随着对谷氨酰胺的生理、生化、临床等方面研究的深入和发展，谷氨酰胺对生命活动的重要性正日渐突出，目前，谷氨酰胺已被普遍认为是一种条件必需性氨基酸。我国至今没有实现谷氨酰胺的发酵法工业化生产，作为下游过程的分离纯化技术不过关乃是最重要的原因之一。谷氨酰胺发酵过程中的主要副产物是谷氨酸，而谷氨酰胺和谷氨酸两者分子结构和化学性质相近，分离困难，而且谷氨酰胺不稳定，分离过程中酸性下容易转化成谷氨酸。

国内外一般采用阳离子交换树脂直接吸附、阳离子和阴离子交换树脂组合处理等。日本专利说明书(昭62-148459)公开了一种用铵型强酸性离子交换树脂分离发酵液中的谷氨酰胺的方法，但该方法的发酵液谷氨酸浓度很低因而分离容易，而且铵型强酸树脂对氨基酸的交换容量比其氢型要小得多，此外该方法的实验规模也很小(Φ32×250mm的交换柱)。1994年《工业微生物》第2期第1页提出谷氨酰胺提取的工艺如下：

发酵液除菌体 → 732柱(H型)吸附 → 0.4N氨水洗脱 → 717柱(OH型)吸附 → 0.1NHCl洗脱 → 减压浓缩 → 乙醇沉淀

此工艺存在的问题是：谷氨酰胺在与强酸H型树脂交换时发生向谷氨酸的转化，大大影响收率。此外用盐酸洗脱使得谷氨酰胺和谷氨酸洗脱峰重叠严重而影响分离。

上述分离提取工艺，或是被处理发酵液中谷氨酸等杂质浓度很低因而容易分离、或是被处理发酵液中谷氨酸等杂质含量高造成分离不良，因而成品质量差、总收率低，此外还普遍存在试验规模过小等不足。

本发明的目的是提出一种在较大的提取规模下，仅采用一种阴离子交换树脂，以双柱串联分别交换吸附谷氨酰胺发酵液中的谷氨酸等杂质和谷氨酰胺，然后弱酸选择性洗脱一柱，最终分离提取出符合药用标准谷氨酰胺的工艺。

本发明的工艺包括下述顺序的步骤：

(1) 发酵液絮凝除菌体：将谷氨酰胺发酵液调节至pH2.0—5.0，缓慢搅拌下以1—10毫升/升发酵液的量加入浓度为2—3%的高分子絮凝剂，然后加入500—2000ppm的金属盐，缓慢搅拌混合30—60分钟后静置30—60分钟，离心或过滤除去固相，用2—5倍固相体积的去离子水洗涤固相，收集滤液和洗涤水，合并后待用。

(2) 离子交换树脂的处理：强碱性离子交换树脂按常规方法处理后装柱，然后转成OH型后待用。

(3) 发酵液除去谷氨酸等杂质：由步骤(1)处理得到的合并液以0.1—4.0BV/小时的流速通入步骤(2)处理好的强碱性离子交换柱，通完液后同流速下用0.6—2倍床层体积的去离子水顶出柱中液体，收集所有离子交换柱的流出液待用。

(4) 离子交换吸附谷氨酰胺：由步骤(3)处理得到的料液以0.1—4.0BV/小时的流速通入步骤(2)处理好的强碱性离子交换柱，通完液后，相同流速下用0.5—5倍树脂床体积的去离子水洗柱，洗完后以0.1—3.0BV/小时的流速用0.01—2.0N的弱酸洗脱，收集谷氨酰胺高流份洗脱液待用。

(5) 谷氨酰胺洗脱液的真空浓缩：由步骤(4)处理得到的谷氨酰胺洗脱液在40°C—80°C下真空浓缩至谷氨酰胺浓度50—100克/升，保温待用。

(6) 谷氨酰胺浓缩液的脱色：将步骤(5)处理得到的谷氨酰胺浓缩液调至pH 3.0—6.0，按0.1%—1.0%的比例加入药用级活性炭，50°C—80°C保温下搅拌0.5—1小时，然后同温下保温过滤数次至滤液中无炭粒。

(7) 谷氨酰胺浓缩液的结晶：将步骤(6)处理得到的谷氨酰胺脱色液调至pH 4.0—6.5，然后以1—3°C/小时的降温速率降温，温度每降低10°C，停止降温并同温下保温2—6小时，然后继续以同样速率降温，直至液温降至0°C—5°C后，同温下维持结晶8—14小时后过滤，收集晶体待用。

(8) 谷氨酰胺的晶体洗涤：将步骤(7)处理得到的谷氨酰胺晶体以1—4毫升/克晶体的比例加入有机溶剂，35°C—45°C保温下搅拌1—3小时，过滤，收集晶体待用。

(9) 谷氨酰胺晶体的干燥：将步骤(8)处理得到的谷氨酰胺晶体在40°C—60°C下干燥6—8小时，然后80°C干燥1—4小时，冷却后即得谷氨酰胺成品。

上述过程所用的去离子水都须经脱二氧化碳处理，上柱方式为正上柱。

步骤(1)所述的谷氨酰胺发酵液的pH用盐酸、硫酸、硝酸之一调节。

步骤(1)所述的高分子絮凝剂是阴离子型、阳离子型、非离子型聚丙烯酰胺之一。

步骤(1)加入的金属盐是硫酸铝、硫酸锌、氯化锌、三氯化铁之一。

步骤(2)中强碱性离子交换树脂是717#、711#、D2004、201×2、JK204、JK206、D201、D202、D241、D293、JK208、D290、D296、D261之一。

步骤(4)所述的弱酸是甲酸、醋酸、柠檬酸之一。

步骤(8)所述的有机溶剂是甲醇、无水乙醇、95%乙醇、丙酮之一。

采用上述工艺处理不同批次的谷氨酰胺发酵液，有效地避免了谷氨酰胺在阳离子交换柱上向谷氨酸的转化、强酸洗脱阴离子柱时谷氨酰胺和谷氨酸之间

分离不良的问题，谷氨酰胺的总收率为70%左右，而且得到的谷氨酰胺产品质量符合日本药典。

下面结合实例对本发明作进一步说明。

实施例 1：

谷氨酰胺发酵液主要成分：谷氨酰胺41克/升，谷氨酸8.3克/升，硫酸铵11克/升，玉米浆、葡萄糖、无机盐少量，pH6.5，发酵液体积10升。

离子交换树脂的处理：强碱性离子交换树脂JK204先用清水漂洗干净，用过量的1N盐酸处理，去离子水漂洗干净后再用过量的1N氢氧化钠处理，这样用酸碱反复处理3次后，用去离子水漂洗干净，树脂在真空下脱气30分钟后装入Φ100×1000毫米的玻璃层析柱中，最后用过量的1N氢氧化钠处理成羟型，去离子水漂洗柱后待用。

发酵液用1.5N硫酸调节pH至5.0，缓慢搅拌下以10毫升/升发酵液的量加入浓度2%的阳离子型聚丙烯酰胺，混匀后加入500ppm的氯化锌，继续缓慢搅拌30分钟混均匀后静置30分钟，过滤，固相用2倍固相体积的去离子水洗涤并过滤，合并收集滤液和洗涤水。

合并收集的料液以0.5BV/小时流速通入第一个JK204阴离子交换柱，第一个交换柱床层体积4升，上完液后用一倍床层体积的去离子水以相同流速顶出柱中料液。第一个柱的流出液以1.0BV/小时的流速通入第二个JK204阴离子交换柱，第二个交换柱床层体积7升，上完液后用一倍床层体积的去离子水相同流速下水洗第二个柱，洗完后用0.1N醋酸1.0BV/小时流速洗脱第二柱，收集谷氨酰胺高流分洗脱液。

收集的谷氨酰胺高流分洗脱液70°C真空浓缩至谷氨酰胺浓度60克/升，70°C保温下用1N硫酸或氢氧化钠调节pH至4.0，并按0.5%的量加入医用活性炭，缓慢搅拌30分钟脱色，过滤三次，滤液用1N氢氧化钠调pH至5.0后，以2°C/小时的降温速率降温，每降温10°C维持4小时，降温至0°C后维持温度结晶12小时。过滤，晶体以1毫升/克的量加入甲醇，35°C下搅拌1小时后过滤，晶体60°C干燥6小时，80°C干燥4小时，冷却后得谷氨酰胺成品。谷氨酰胺总收率为70.3%。

整个过程所用的去离子水都须经脱二氧化碳处理，上柱方式为正上柱。

实施例 2：

谷氨酰胺发酵液主要成分为：谷氨酰胺35.6克/升，谷氨酸10.1克/升，氯化铵1升，葡萄糖、玉米浆、无机盐少量pH6.7，发酵液体积10升。

发酵液用1.5N盐酸调节pH至2.0，缓慢搅拌下以1毫升/升发酵液的量加入浓度3%的阴离子型聚丙烯酰胺，混匀后加入2000ppm的硫酸锌，继续缓慢搅拌45分钟混均匀后静置45分钟，过滤，固相用4倍固相体积的去离子水洗涤并过滤，合并收集滤液和洗涤水。

合并收集的料液以4BV/小时流速通入第一个717阴离子交换柱，上完液后用0.6倍床层体积的去离子水以相同流速顶出柱中料液。第一个柱的流出液以0.1BV/小时的流速通入第二个717阴离子交换柱，上完液后用三倍床层体积的去离子相同流速下水洗第二个柱，洗完后用0.01N柠檬酸3.0BV/小时流速洗脱第二柱，收集谷氨酰胺高流分洗脱液。

收集的谷氨酰胺高流分洗脱液40°C真空浓缩至谷氨酰胺浓度50克/升，40°C保温下用1.5N盐酸或氢氧化钠调节pH至3.0，并按0.1%的量加入医用活性炭，缓慢搅拌45分钟脱色，滤纸过滤四次，滤液用1N氢氧化钠调节pH至4.0后，以1°C/小时的降温速率降温，每降温10°C维持2小时，降温至3°C后维持温度结晶8小时。过滤，晶体以2.5毫升/克的量加入95%乙醇，40°C下搅拌2小时后过滤，晶体50°C干燥7小时，80°C干燥2小时，冷却后即得谷氨酰胺成品。其他同实施例1。谷氨酰胺的总收率为69.0%。

实施例 3：

谷氨酰胺发酵液主要成分为：谷氨酰胺21克/升，谷氨酸17.5克/升，氯化铵11克/升，葡萄糖、玉米浆、无机盐少量，pH6.7，发酵液体积10升。

发酵液用1.5N硝酸调节pH至3.0，缓慢搅拌下以5毫升/升发酵液的量加入浓度2%的阳离子型聚丙烯酰胺，混匀后加入1000ppm的硫酸铝，继续缓慢搅拌60分钟混均匀后静置60分钟，过滤，固相用5倍固相体积的去离子水洗涤并过滤，合并收集滤液和洗涤水。

合并收集的料液以0.1BV/小时流速通入第一个711阴离子交换柱，上完液后用2倍床层体积的去离子水以相同流速顶出柱中料液。第一个柱的流出液以4.0BV/小时的流速通入第二个711阴离子交换柱，上完液后用五倍床层体积的去离子相同流速下水洗第二个柱，洗完后用2.0N甲酸0.1BV/小时流速洗脱第二柱，收集谷氨酰胺高流分洗脱液。

收集的谷氨酰胺高流分洗脱液80°C真空浓缩至谷氨酰胺浓度100克/升，80°C保温下用1.5N硝酸或氢氧化钠调节pH至6.0，并按1.0%的量加入医用活性炭，缓慢搅拌60分钟脱色，滤纸过滤二次，滤液用1N氢氧化钠调节pH至6.5后，以3°C/小时的降温速率降温，每降温10°C维持6小时，降温至5°C后维持温度结晶14小时。过滤，晶体以4毫升/克的量加入丙酮，45°C下搅拌3小时后过滤，晶体40°C干燥8小时，80°C干燥1小时，冷却后即得谷氨酰胺成品。其他同实施例1。谷氨酰胺的总收率为71.6%。